

PATENT COOPERATION TREATY

Rec'd PCT/PTO

08 MAR 2005

MAR 03 2005

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

**NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT**

(PCT Administrative Instructions, Section 411)


To:

HARA, Kenzo
HARAKENZO PATENT LAW FIRM
Daiwa Minamimorimachi Building
2-6, Tenjinbashi 2-chome Kita,
Kita-ku
Osaka-shi, Osaka 530-0041
Japan

Date of mailing (day/month/year) 27 November 2003 (27.11.03)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference P028P02/PCT	
International application No. PCT/JP03/09973	
International publication date (day/month/year) Not yet published	
Applicant JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION et al	International filing date (day/month/year) 06 August 2003 (06.08.03) Priority date (day/month/year) 09 September 2002 (09.09.02)

- The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
- An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
09 Sept 2002 (09.09.02)	2002-263414	JP	17 Octo 2003 (17.10.03)
02 July 2003 (02.07.03)	2003-190637	JP	17 Octo 2003 (17.10.03)

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 338.70.10	Authorized officer Yuichiro AIDA (Fax 338 7010)  Telephone No. (41-22) 338 8994
--	--

24.09.03

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

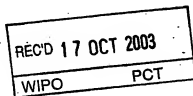
Rec'd PCT/JP 03 MAR 2005

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2002年 9月 9日
Date of Application:

出願番号 特願2002-263414
Application Number:
[ST. 10/C]: [JP2002-263414]

出願人 科学技術振興事業団
Applicant(s): 鹿児島大学長

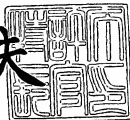


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 8月 5日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願
【整理番号】 P028-P02
【提出日】 平成14年 9月 9日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C07C211/00
C07K 1/107

【発明者】

【住所又は居所】 鹿児島県鹿児島市下伊敷1-13-1-106

【氏名】 隅田 泰生

【発明者】

【住所又は居所】 鹿児島県鹿児島市唐湊1-15-11-801

【氏名】 荒野 明男

【発明者】

【住所又は居所】 鹿児島県鹿児島市下伊敷1-13-1-106

【氏名】 林 秀樹

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府箕面市半町3-5, C-114

【氏名】 楠本 正一

【発明者】

【住所又は居所】 アメリカ合衆国, ワシントン州 98177, シアトル
ノース ウェスト シックス アベニュー 130
14

【氏名】 マイケル ソーベル

【特許出願人】

【持分】 060/100

【識別番号】 396020800

【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【特許出願人】

【持分】 040/100
 【識別番号】 391012523
 【氏名又は名称】 鹿児島大学長

【代理人】

【識別番号】 100080034
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 原 謙三
 【電話番号】 06-6351-4384

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 003229
 【納付金額】 12,600円
 【その他】 国以外のすべての者の持分の割合060/100

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1
 【包括委任状番号】 0111475

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 多岐用途型リンカー化合物及びリガンド、並びにそれらの製造

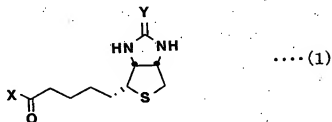
方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】

一般式 (1)

【化1】



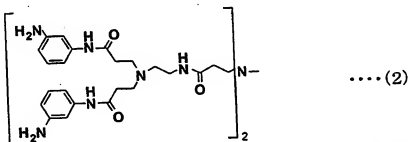
(式中、YはO又はNHで表される構造を有する) にて表される構造を備え、

上記Xは、末端に芳香族アミノ基を有するとともに主鎖に炭素-窒素結合を有していてもよい炭化水素誘導鎖を、4鎖含んでなる多岐部位である構造を備えていることを特徴とする多岐用途型リンカー化合物。

【請求項2】

上記Xは、一般式 (2)

【化2】



にて表される構造を備えていることを特徴とする請求項1記載の多岐用途型リンカー化合物。

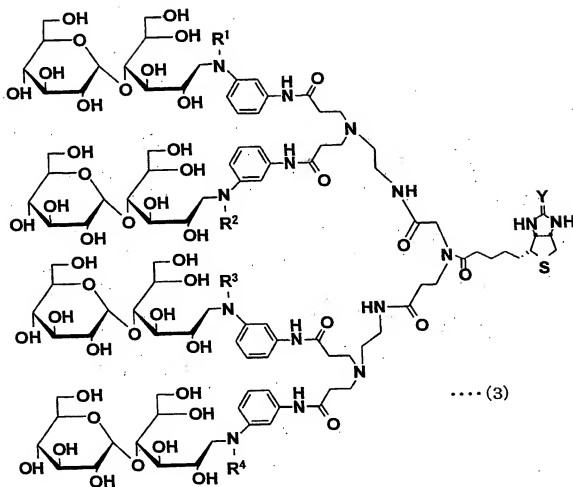
【請求項3】

請求項1又は2記載のリンカー化合物の芳香族アミノ基に、糖分子を導入してなることを特徴とするリガンド。

【請求項4】

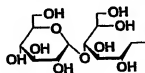
一般式 (3)

【化3】



(式中、YはO又はNHで表される構造を有し、 R^1 , R^2 , R^3 , R^4 は、それぞれ独立して、

H又は



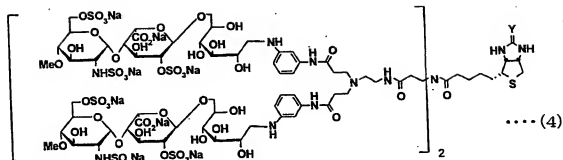
で表される構造を有する)

にて表される構造を備えていることを特徴とするリガンド。

【請求項5】

一般式 (4)

【化4】



(式中、YはO又はNHで表される構造を有する) にて表される構造を備えていることを特徴とするリガンド。

【請求項6】

ビオチン系化合物と、芳香族アミノ基末端が保護基によって保護された分岐鎖を4鎖有するアミン化合物との縮合反応を行うステップと、

上記芳香族アミノ基末端の保護基を脱保護するステップとを含んでいることを特徴とするリンカー化合物の製造方法。

【請求項7】

請求項1又は2記載のリンカー化合物と、糖分子とを用いて、還元アミノ化反応を行うことを特徴とするリガンドの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、チップテクノロジーやクロマトグラフィ、バイオブロープ等にて糖を使用する際に、糖の導入を好適にかつ効率よく行うために用いられる多岐用途型リンカー化合物、及び該多岐用途型リンカー化合物に糖を導入してなるリガンド、並びにこれらの製造方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

生体内に存在する種々の糖は、特定のタンパク質と相互作用して、生物の活動や生命を維持するためのメカニズムの中で重要な役割を果たしている。そのため、糖とタンパク質との相互作用を調べることは、糖の生物活性を調べる上で重要

となる。

【0003】

糖と相互作用するタンパク質は、例えば、以下の手法によって検出される。すなわち、表面プラズモン共鳴（以下、SPRと記載する）法によれば、表面に糖が固定されているセンサチップを用いて、該糖とタンパク質との生化学的結合を調べることができる。また、アフィニティクロマトグラフィの担体に糖を固定すれば、糖と特異的に相互作用するタンパク質を分離精製することができる。さらに、遺伝子工学にて用いられるバイオプローブとして糖を用いれば、糖と相互作用するタンパク質を検出することができる。

【0004】

本発明者らは、これまでに、上記SPRのセンサチップやアフィニティクロマトグラフィの担体等のタンパク質分析用の支持体に、種々のオリゴ糖を一段階にて導入して固定可能なリンカー化合物及び該リンカー化合物にオリゴ糖を導入してなるリガンドを見出している（例えば、非特許文献1等を参照）。

【0005】

上記リンカー化合物は、芳香族アミン部位とビオチン部位とを有している。このうち、上記芳香族アミン部位は、オリゴ糖を導入するために用いられる。また、上記ビオチン部位は、ビオチン-ストレプトアビジン（又はアビジン）結合を利用して、タンパク質分析用の支持体表面に固定化するために用いられる。従って、このリンカー化合物を介することによって、オリゴ糖をタンパク質分析用の支持体に固定化することができる。

【0006】

ところで、オリゴ糖は1分子だけでは活性がそれほど高くないため、オリゴ糖の生物活性を評価する場合には、通常、上記タンパク質分析用の支持体に3単位以上のオリゴ糖を集集合させて導入することが必要となる。そこで、上記リンカー化合物を介して、オリゴ糖を上記支持体に固定化する場合には、上記リンカー化合物に糖が導入されてなるリガンドを上記支持体表面上に集集合させることによって、3単位以上のオリゴ糖を集集合させなければならない。

【0007】

【非特許文献1】

「日本化学会第79回春季年会一講演予稿集II」、社団法人日本化学会、2001年3月15日、p. 1042

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、上記従来のリンカー化合物を含んでなるリガンドを用いた場合、オリゴ糖の糖鎖をセンサチップ表面に2次元的に集合化させて配列させることは可能であるが、その集合状態を制御して、再現性よく配列させることが困難であるという技術的課題が残されている。

【0009】

すなわち、タンパク質分析用の支持体表面上に固定化されたオリゴ糖を用いて、該オリゴ糖の生物活性を精度よく観測するためには、オリゴ糖の糖鎖の集合状態を同一にし、オリゴ糖とタンパク質との間の相互作用を再現性よく観測することが求められる。ところが、上記従来のリガンドを用いた場合、3単位以上のオリゴ糖の糖鎖の集合状態は、リガンドの集合状態に依存することになり、3単位以上のオリゴ糖の糖鎖の集合状態を常に同一にすることができない可能性がある。オリゴ糖の糖鎖の集合状態が異なれば、観測されるオリゴ糖とタンパク質との相互作用も異なることになり、オリゴ糖の生物活性を再現性よく評価することが困難となる。

【0010】

本発明は、上記の課題を解決するためになされたものであって、その目的は、タンパク質分析用の支持体上に糖を再現性よく2次元的に配列し得る新規なリンカー化合物、及び、該リンカー化合物に糖分子が導入されてなる新規なリガンド、並びにこれらの製造方法を提供することにある。

【0011】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討を行った結果、4単位以上の糖分子を導入可能な部位として4つの芳香族アミノ基を有し、かつ、糖分子と特異的に相互作用するタンパク質の検出や分離を行う際に用いられるタンパク質

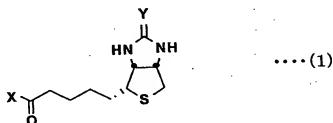
分析用の支持体に結合可能な部位としてビオチン部位又はイミノビオチン部位（以下、ビオチン部位と総称して記載する）を有する新規な多岐用途型リンカー化合物を用いることによって、上記支持体に4単位以上の糖分子を再現性よく2次元的に配列させることができることを見出し、本発明を完成させるに至った。

【0012】

すなわち、本発明の多岐用途型リンカー化合物（以下、リンカー化合物と記載する）は、上記課題を解決するために、一般式（1）

【0013】

【化5】



【0014】

（式中、YはO又はNHで表される構造を有する）にて表される構造を備え、上記Xは、末端に芳香族アミノ基を有するとともに主鎖に炭素-窒素結合を有しているもよい炭化水素誘導鎖を、4鎖含んでなる多分岐部位である構造を備えていることを特徴としている。

【0015】

上記炭化水素誘導鎖とは、炭素及び水素からなる炭化水素鎖にて、一部の炭素や水素が、他の原子や置換基に置き換わっていてもよいものを指すものとする。すなわち、上記炭化水素誘導鎖とは、末端に芳香族アミノ基を有し、炭化水素鎖の主鎖構造である炭素-炭素結合（C-C結合）の一部が炭素-窒素結合（C-N結合）やアミド結合（CO-NH結合）に置き換わっていてもよいものを指す。

【0016】

上記の構成によれば、上記リンカー化合物は、上記タンパク質分析用の支持体に固定可能な部位として、ビオチン部位を有している。このビオチン部位は、ストレプトアビジン又はアビジン（以下、アビジンと総称して記載する）に高い親

和性を示す。そのため、アビジンが固定されている支持体表面にて、ビオチン-アビジン結合が形成されるので、上記リンカー化合物を、上記支持体表面上に簡単に固定化することができる。

【0017】

また、上記リンカー化合物は、種々の糖分子を簡便に導入できる部位として、芳香族アミノ基を有している。上記芳香族アミノ基は、各炭化水素誘導鎖に含まれているので、上記リンカー化合物には、4単位以上の糖分子を導入することができる。また、導入された糖分子は、一つのリンカー化合物に導入されているので、導入された4単位以上の糖分子間を所定の間隔に保つことができる。これにより、上記リンカー化合物を介して、タンパク質分析用の支持体上に導入される糖分子の配列を再現性よく得ることができる。

【0018】

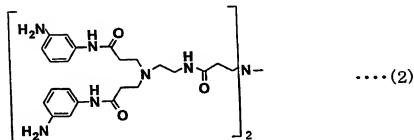
さらに、上記リンカー化合物を用いれば、上記支持体表面に4単位以上の糖分子を集約化させることができるので、糖分子の十分な生物活性を得ることができるとともに、糖分子を再現性よく配列させることができる。これにより、糖分子とタンパク質との相互作用を検出することが可能になり、糖分子の生物活性を再現性よく評価することが可能になる。

【0019】

上記一般式(1)にて表されるリンカー化合物において、上記Xは、一般式(2)

【0020】

【化6】



【0021】

にて表される構造を備えていることが好ましい。

【0022】

上記リンカー化合物のXは、上記炭化水素誘導鎖を4鎖有しているので、このリンカー化合物を介して、上記支持体上に4単位以上の糖分子を導入することが可能である。そのため、上記リンカー化合物を用いることによって、上記支持体表面にて導入された糖分子間の間隔を制御して、これらの糖分子を集合化させることができる。そのため、上記支持体表面上にて、糖分子の配列を再現性よく得ることができる。

【0023】

従って、上記リンカー化合物を用いることにより、再現性のよい糖分子の生物活性を得ることが可能となる。これにより、糖分子の生物活性を利用するSPRやアフィニティクロマトグラフィ、バイオプローブ等にて、種々の糖分子とタンパク質との特異的な相互作用を好適に検出することが可能になる。

【0024】

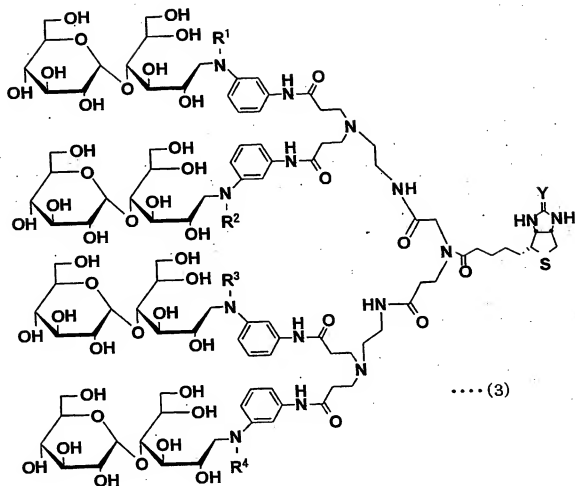
また、本発明のリガンドは、上記の課題を解決するために、上記したいずれかのリンカー化合物の芳香族アミノ基に、糖分子を導入してなるものであることを特徴としている。

【0025】

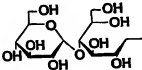
上記リガンドは、具体的には、一般式(3)

【0026】

【化7】



(式中、YはO又はNHで表される構造を有し、 R^1 , R^2 , R^3 , R^4 は、それぞれ独立して、

H又は  で表される構造を有する)

【0027】

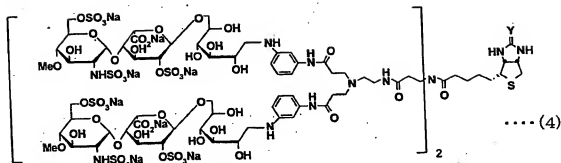
にて表される構造を備えていることが好ましい。

【0028】

あるいは、上記リガンドは、一般式(4)

【0029】

【化8】



【0030】

(式中、YはO又はNHで表される構造を有する)にて表される構造を備えていることが好ましい。

【0031】

上記リガンドのいずれかを用いることにより、上記タンパク質分析用の支持体表面に、4単位(一般式(4)にて表される構造を備えるリガンドの場合)又は4単位以上(一般式(3)にて表される構造を備えるリガンドの場合)の糖分子を固定化することができる。また、一つのリガンドは、4単位以上の糖分子を有しているので、上記支持体表面に2次的に4単位以上の糖分子を集積化させることができるとともに、再現性よく配列させることができる。それゆえ、上記リガンドを用いることにより、SPRやアフィニティクロマトグラフィ、バイオプローブ等にて、種々の糖分子とタンパク質との特異的な相互作用を効率よく検出することが可能になる。

【0032】

また、本発明のリンカー化合物の製造方法は、上記の課題を解決するために、ビオチン系化合物と、芳香族アミノ基末端が保護基によって保護された分岐鎖を4鎖有するアミン化合物との縮合反応を行うステップと、上記芳香族アミノ基末端の保護基を脱保護するステップとを含んでいることを特徴としている。

【0033】

上記ビオチン系化合物とは、アミン化合物の二級アミノ基と反応し得るように、ビオチン構造又はチオビオチン構造に置換基を導入して活性化されているものを指す。

【0034】

上記の方法によれば、アビジンが固定されているタンパク質分析用の支持体に固定可能なビオチン部位と、糖分子を簡便に導入できる芳香族アミノ基とを有している、本発明のリンカー化合物を得ることができる。

【0035】

また、本発明のリガンドの製造方法は、上記リンカー化合物のいずれかと、糖分子とを用いて、還元アミノ化反応を行うことを特徴としている。

【0036】

上記の方法によれば、還元アミノ化反応により、リンカー化合物に簡便に糖分子を導入して、本発明のリガンドを得ることができる。

【0037】

【発明の実施の形態】

以下、本発明について詳細に説明する。

【0038】

本発明の多岐用途型リンカー化合物（以下、リンカー化合物）は、オリゴ糖等の糖（以下、糖分子と記載する）の生物活性を利用するSPRやアフィニティクロマトグラフィ、遺伝子工学でのバイオプローブ等のように、糖分子と特異的に相互作用するタンパク質の検出や分離を行う場合に、タンパク質分析用の支持体に糖分子の導入を好適に行うために用いられるものである。また、上記リンカー化合物は、タンパク質との非特異的な相互作用を有していないため、上記のようなタンパク質の検出や分離に好適に用いることができる。

【0039】

すなわち、本発明のリンカー化合物は、具体的には、前記一般式（1）にて示すように、上記タンパク質分析用の支持体に固定可能な部位として、ビオチン部位又はイミノビオチン部位（以下、ビオチン部位と総称）を有し、糖分子を導入可能な部位として、芳香族アミノ基を有している。

【0040】

ビオチン又はチオビオチン（以下、ビオチンと総称）は、塩基性の糖タンパク質であるストレプトアビジン又はアビジン（以下、これらを総称して、アビジン

と記載する)と特異的に相互作用することが知られている。そのため、アビジンが固定されている支持体表面に、ビオチン部位を有する上記リンカー化合物を接触させると、ビオチン-アビジン結合が形成されて、上記リンカー化合物を上記支持体表面に簡単に固定化することができる。

【0041】

また、上記リンカー化合物は、前記一般式(1)にてXで表される構造を備え、末端に芳香族アミノ基を有するとともに主鎖に炭素-窒素結合を有していてもよい炭化水素誘導鎖を、4鎖含んでなる多分岐部位を有している。この多分岐部位に含まれる芳香族アミノ基のアミノ基($-NH_2$ 基)は、糖分子中の平衡によって生じるアルデヒド基($-CHO$ 基)又はケトン基($-CR' O$ 基、 R' は炭化水素基)と反応する。そして、この反応によって形成されたシッフ塩基を引き続き還元することによって、芳香族アミノ基に糖分子が導入されることになる。上記Xは、4つの芳香族アミノ基末端を有しているのので、上記リンカー化合物には、後述するように、4単位以上の糖分子を導入することができる。

【0042】

上記Xは、具体的には、前記一般式(2)にて示すように、2鎖の炭化水素誘導鎖が、芳香族アミノ基とは反対側の末端にて、1つの窒素(N)に結合した2分岐構造を2つ有している。そして、この2つの2分岐構造の上記窒素が、 $-CO-CH_2-CH_2-$ を介して、1つの窒素(N)に結合することによって多分岐構造を形成している。

【0043】

このように、上記Xは、炭素や窒素等の原子にて、上記炭化水素誘導鎖を複数結合して分岐構造を形成している多分岐部位である構造を備えている。なお、上記Xに含まれる複数の炭化水素誘導鎖は、すべて同じであることが好ましいが、末端に芳香族アミノ基を有していれば、互いに異なる構造を備えていてもよい。

【0044】

以上のように、一般式(1)にて表される構造を備えているリンカー化合物は、ビオチン部位と芳香族アミノ基末端とを有している。これにより、上記リンカー化合物を介して、上記タンパク質分析用の支持体上に、糖分子を強固にかつ簡

単に結合させることができる。

【0045】

また、上記リンカー化合物は、多分岐部位を有し、該多分岐部位の各末端に芳香族アミノ基を有している。そのため、上記リンカー化合物に糖分子を導入してなるリガンド（後述）を用いることにより、上記支持体表面に効率よく4単位以上の糖分子を集合化させることができる。また、一つのリンカー化合物には4単位以上の糖分子を導入することができるので、上記リガンドを支持体表面に結合させた場合に、複数の糖分子を再現性よく配列させることができる。

【0046】

さらに、上記リンカー化合物は、タンパク質との非特異的な相互作用の影響をほぼ無視することができる。それゆえ、本発明のリンカー化合物を用いることによって、糖分子の生物活性を再現性よく評価することが可能になる。

【0047】

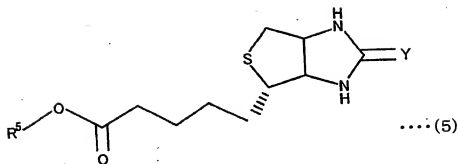
上記リンカー化合物は、以下に示す製造方法によって製造される。すなわち、上記リンカー化合物は、ビオチン系化合物と、芳香族アミノ基末端が保護基によって保護された分岐鎖を4鎖有するアミン化合物との縮合反応を行い、その後、上記芳香族アミノ基末端の保護基を脱保護することによって製造される。

【0048】

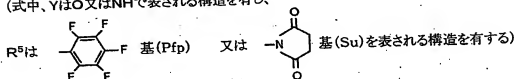
上記ビオチン系化合物としては、下記一般式（5）

【0049】

【化9】



(式中、YはO又はNHで表される構造を有し、



【0050】

にて表される構造を備えている化合物を挙げることができる。上記ピオチン系化合物は、ペンタフルオロフェニル基(Pfp)又はスクシンイミド基(Su)を有するエステル化合物である。そのため、上記ピオチン系化合物は、これらの置換基によって活性化されているので、アミン化合物の二級アミノ基($-NH$ 基)と反応することができる。

【0051】

また、上記アミン化合物は、二級アミノ基と、保護基によって保護された芳香族アミノ基末端を有する分岐鎖とを含んでいれば特に限定されるものではなく、上記したリンカー化合物の多分岐部位(一般式(1)のX)に相当する構造を有していればよい。

【0052】

従って、上記分岐鎖は、上記した炭化水素誘導鎖に含まれる芳香族アミノ基の代わりに、保護基によって保護された芳香族アミノ基末端を有する以外は、上記炭化水素誘導鎖に含まれる構造を有していればよい。つまり、上記分岐鎖は、炭素及び水素からなる炭化水素鎖にて、一部の炭素や水素が他の原子や置換基に置き換わっていてもよいものである。より具体的には、上記分岐鎖は、保護基によって保護された芳香族アミノ基末端を有するとともに、炭化水素鎖の主鎖構造である炭素-炭素結合(C-C結合)の一部が炭素-窒素結合やアミド結合(CO

-NH結合)に置き換わっていてもよいものである。

【0053】

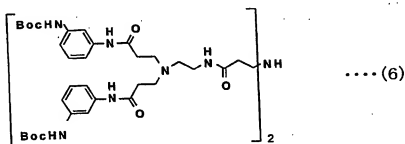
また、上記保護基とは、芳香族アミノ基のアミノ基が上記縮合反応によって反応しないように導入される置換基である。このような保護基は、二級アミノ基の保護基を脱保護する際に影響を受けないものであれば、特に限定されるものではない。上記保護基としては、例えば、*t*-ブトキシカルボニル基(-COOC(CH₃)₃; Boc基と記載する)、ベンジル基、アリルカルバメート基(-COOCH₂CH=CH₂, Alloc基)等を挙げることができる。

【0054】

上記アミン化合物としては、例えば、下記一般式(6)

【0055】

【化10】



【0056】

にて表される構造を備えている化合物を挙げることができる。なお、このアミン化合物の合成方法については、後の実施例にて詳述する。

【0057】

上記ピオチン系化合物とアミン化合物との縮合反応により、ピオチン系化合物のPfpやSu等の置換基と、アミン化合物の二級アミノ基とが縮合して、アミド結合が形成される。その後、芳香族アミノ基末端の保護基を脱保護して、保護基を取り外し、芳香族アミノ基にすることによって、上記したリンカー化合物を得ることができる。

【0058】

次に、上記リンカー化合物の芳香族アミノ基に、糖分子が導入されてなるリガンドについて説明する。本発明のリガンドは、リンカー化合物のアミノ基が、糖

分子中の平衡によって生じるアルデヒド基又はケトン基と反応し、この反応によって形成されたシッフ塩基を引き続き還元することによって、芳香族アミノ基に糖分子が導入されることになる。

【0059】

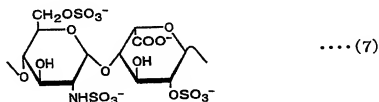
本発明のリガンドに含まれる糖分子は、還元糖であれば特に限定されない。糖分子としては、例えば、グルコース、ガラクトース、マンノース等の単糖類、結合している糖の数が2糖～10糖であるマルトース、ラクトース、後述する硫酸化オリゴ糖等のオリゴ糖類、単糖類やオリゴ糖類が組み合わされて糖数が11以上であるヘパリン、コンドロイチン硫酸、ヘパラン硫酸等の多糖類を挙げることができる。

【0060】

また、上記オリゴ糖類として、抗血液凝固活性を有することで知られている硫酸化多糖ヘパリン中の下記一般式(7)

【0061】

【化11】

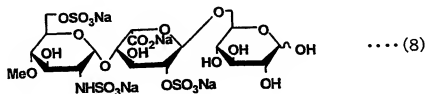


【0062】

にて表される特定の部分二糖構造 (GlcNS6S-IdoA2S) を有する硫酸化オリゴ糖や、該硫酸化オリゴ糖の還元末端である水酸基にグルコースを導入してなる下記一般式(8)

【0063】

【化12】



【0064】

にて表される構造を備えているオリゴ糖を挙げることができる。

【0065】

なお、上記オリゴ糖類や多糖類は、同一の単糖分子からなる単一オリゴ糖や単一多糖であってもよく、種々の単糖分子やその誘導体からなる複合糖質や、種々の単糖分子やその誘導体、オリゴ糖類を含んでなる複合多糖類であってもよい。また、上記糖分子は、いずれも、自然界から単離・精製して得られる種々の天然の糖であってもよく、人工的に合成された糖であってもよい。

【0066】

本発明のリガンドは、具体的には、前記一般式(3)にて表される構造を備えているものである。この一般式(3)にて表される構造を備えているリガンドは、前記一般式(1)にて表され、Xが前記一般式(2)にて表される構造を備えているリンカー化合物に、糖分子としてマルトースを導入してなるものである。一般式(2)にて表されるXは、4鎖の炭化水素誘導鎖を含む構造を備えている。この各炭化水素誘導鎖の芳香族アミノ基には、1単位又は2単位のマルトースを導入することができる。そのため、一般式(3)にて表される構造を備えているリガンドは、上記リンカー化合物に4単位以上8単位以下のマルトースが結合したものとなる。

【0067】

また、本発明の他のリガンドは、前記一般式(4)にて表される構造を備えているものである。この一般式(4)にて表される構造を備えているリガンドは、前記一般式(1)にて表され、Xが前記一般式(2)にて表される構造を備えているリンカー化合物に、上記一般式(8)にて表される構造を備えている糖分子を導入してなるものである。一般式(2)にて表されるXは、4鎖の炭化水素誘導鎖を含む構造を有しているので、一般式(4)にて表される構造を備えているリガンドは、上記リンカー化合物に4単位の糖分子が結合したものとなる。

【0068】

上記のリガンドは、いずれもリンカー化合物と糖分子とを含んでなっているもので、リンカー化合物内のビオチン部位にて、アビジンを有しているタンパク質分解用の支持体と、ビオチン-アビジン結合により結合することができる。これに

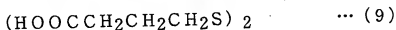
より、このビオチン-アビジン結合を介して、上記支持体表面に4単位の糖分子を集約化して固定化し、再現性よく配列することができる。それゆえ、本発明のリガンドは、SPRやアフィニティクロマトグラフィ、バイオプローブ等にて、種々の糖分子を簡単に導入するために好適に用いることができる。

【0069】

上記リガンドは、該リガンドを含むリガンド溶液に、アビジンを固定したタンパク質分析用の支持体を所定時間浸漬する、あるいは、上記支持体にリガンド溶液を注入することによって、上記支持体表面に導入することができる。

【0070】

例えば、SPRのセンサチップに、上記リガンドを導入する場合には、まず、アビジンを固定したセンサチップを作成する。すなわち、図1(a)に示すように、表面に金(Au)がコーティングされたガラス基板1を用いる。次いで、図1(b)に示すように、下記一般式(9)



にて表される構造を備えている4-チオ酪酸を、金-硫黄結合(Au-S結合)を利用して、ガラス基板1上に固定する。なお、この4-チオ酪酸を固定したガラス基板1に代えて、カルボキシル基を有するポリマーがコートされた基板を用いてもよい。

【0071】

続いて、図1(c)に示すように、カルボジイミド試薬の存在下にて、ガラス基板1上に固定された4-チオ酪酸と、N-ヒドロキシコハク酸イミドとを反応させる。その後、N-ヒドロキシコハク酸イミド部位と、アビジン2が有する末端アミノ基とを縮合させて、図1(d)に示すように、アビジン2をガラス基板1上に固定化する。これにより、アビジンを固定したセンサチップが得られる。

【0072】

次いで、このセンサチップを本発明のリガンドが含まれるリガンド溶液に浸漬する、あるいは、センサチップにリガンド溶液を注入する。これにより、特異的な相互作用として知られているビオチン-アビジン結合によって、上記センサチップ上にリガンドを固定化することができる。

【0073】

なお、リガンド溶液に用いる溶媒としては、特に限定されるものではないが、例えば、PBS等の緩衝液を挙げることができる。リガンド溶液に浸漬する場合の浸漬時間は、0.5時間～1.5時間程度であればよい。また、リガンド溶液を注入する場合の注入量は、0.006mg～0.06mg程度であればよい。

【0074】

このように、本発明のリガンドは、ビオチン部位を有しているので、タンパク質分析用の支持体表面に、一段階にて簡単に糖分子を導入して固定化することができる。

【0075】

【実施例】

以下、本発明のリンカー化合物及びリガンドの合成について、より詳細に説明する。

【0076】

〔実施例1・リンカー化合物の合成〕

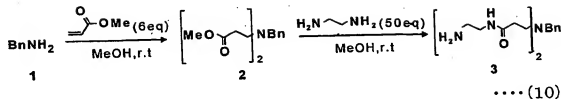
本発明のリンカー化合物は、以下の手順にて合成した。

【0077】

下記一般式(10)にて示すように、室温条件下、メタノール(式中、MeOH)中にて、ベンジルアミン(化合物1、式中Bnはベンジル基を表す)と、6当量のアクリル酸メチルとを反応させて、上記ベンジルアミンに2単位のアクリル酸メチルをマイケル付加させ、収率93%にて化合物2を得た。その後、室温条件下にて、該化合物2が含まれているメタノール中に、大過剰(50当量)のエチレンジアミンを加え、該エチレンジアミンを化合物2に縮合させて、化合物3を得た。

【0078】

【化13】

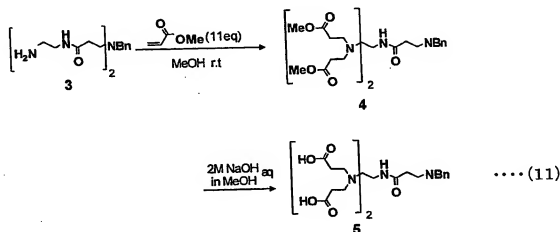


【0079】

続いて、下記一般式(11)にて示すように、上記化合物3が含まれているメタノール中に、室温条件下にて、11当量のアクリル酸メチルを加えて、化合物3にアクリル酸メチルを4単位付加し、収率81%にて化合物4を得た。その後、メタノールに2Mの水酸化ナトリウム水溶液を添加したアルカリ条件下にて、化合物4のメチルエステルを加水分解し、末端にカルボキシル基(-COOH基)を4単位有する化合物5を収率96%にて得た。

【0080】

【化14】



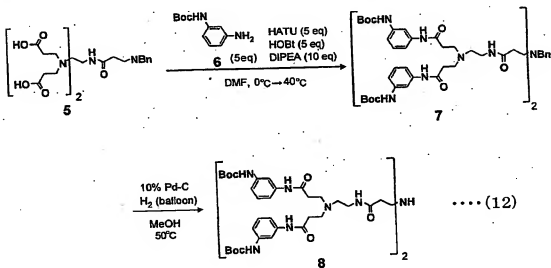
【0081】

次いで、下記一般式(12)にて示すように、5当量の1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(式中、HOBt)及び、10当量のジイソプロピルエチルアミン(式中、DIPEA)を含むN,N-ジメチルホルムアミド(DMF)中にて、0℃から40℃に温度変化させながら、活性化剤として5当量のo-[7-アザベンゾトリアゾール-1-イル]-N,N,N',N'-тетраметилурионiuムヘキサフルオロフォスフェート(式中、HATU)を用いて、上記化合物5の

末端のカルボキシル基に、一方のアミノ基が α -ブトキシカルボニル基（式中Boc、以下、Boc基と記載）にて保護されたフェニレンジアミン誘導体（化合物6、5当量）を縮合させて、化合物7を得た（収率57%）。続いて、水素雰囲気下、50℃のメタノール中にて、パラジウム（10%のPd-C）を用いて化合物7の接触還元を行って、該化合物7の二級アミノ基の保護基であるベンジル基を脱保護し、収率80%にて化合物8を得た。

【0082】

【化15】

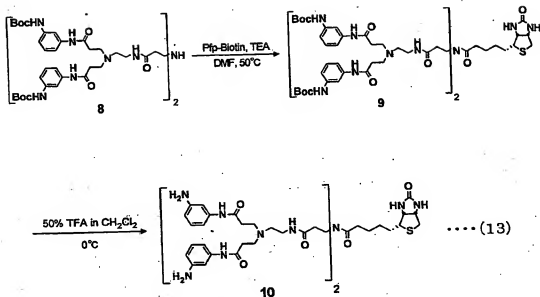


【0083】

次に、下記一般式（13）にて示すように、温度50℃、トリエチルアミン（式中、TEA）の存在下、DMF中にて、脱保護されてフリーになった化合物8のアミノ基に、ペンタフルオロフェニル基（Pfp）にて活性化したビオチンを縮合させ、化合物9を得た（収率63%）。その後、0℃の温度条件下、トリフルオロ酢酸（式中、TFA）を含むCH₂Cl₂中にて、化合物9のBoc基を脱保護して、化合物10を本発明のリンカー化合物として得た。

【0084】

【化16】



【0085】

得られた化合物10は、ESI-MS (positive) $m/z = 1120.62 [M+H]^+$ であり、一般式(13)にて化合物10として示す構造を有していることを確認した。また、NMR測定を行い、得られたNMRデータからも、上記化合物10として示す構造を有していることを確認した。

【0086】

〔実施例2・リガンドの合成〕

実施例1にて得られたリンカー化合物(化合物10)を用いて、前記一般式(3)にて表される構造を備えているリガンドを以下の手順にて合成した。

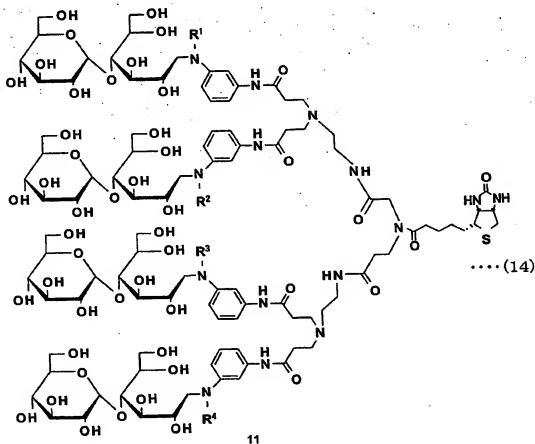
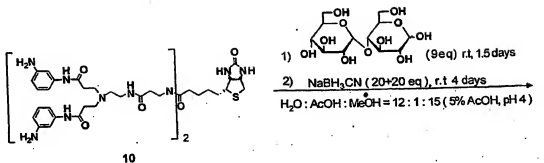
【0087】

下記一般式(14)にて示すように、溶媒として、水：酢酸(AcOH)：メタノール=12:1:15(5%の酢酸溶液、pH4)を用い、上記化合物10に対して、9当量のマルトースを加えて、室温にて1.5日間攪拌した。その後、飛行時間型質量分析計にて、4単位のシッフ塩基が形成されたことを確認した後、還元剤として20当量の NaBH_3CN を2回に分けて加え、室温にて4日間攪拌し、還元アミノ化反応を行った。得られた化合物を、HP-20(ダイアイオン)を用いて精製し、本発明のリガンドとして化合物11を得た(収率89%)。この化合物11は、マルトースが5単位~7単位集合してなる混合物とし

て得られた。

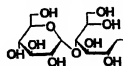
[0088]

[化17]



(式中、R¹, R², R³, R⁴は、それぞれ独立して、

水素又は



で表される構造を有する)

[0089]

[実施例3・リガンドの合成]

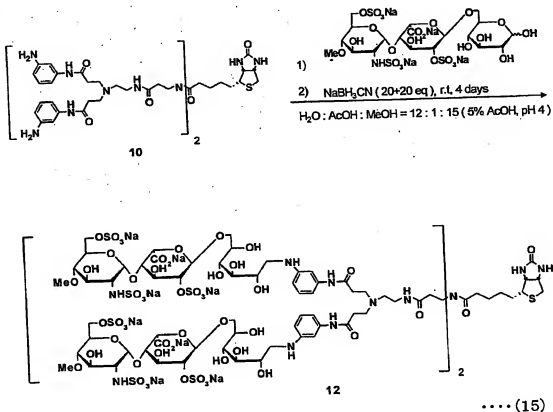
実施例 2 にて得られたリンカー化合物 (化合物 10) を用いて、前記一般式 (5) にて表される構造を備えているリガンドを以下の手順にて合成した。

【0090】

下記一般式 (15) にて示すように、マルトースに代えて、前記一般式 (8) にて表される糖分子を用いた以外は、実施例 2 と同様に操作を行い、化合物 12 を得た。

【0091】

【化 18】



【0092】

【発明の効果】

本発明のリンカー化合物は、以上のように、4 単位以上の糖分子を導入可能な部位として、4 つの芳香族アミノ基を有している。また、糖分子と特異的に相互作用するタンパク質の検出や分離を行う際に用いられるタンパク質分析用の支持体に結合可能な部位として、ビオチン部位又はイミノビオチン部位を有している。

【0093】

それゆえ、上記リンカー化合物を用いることによって、上記支持体に4単位以上の糖分子を再現性よく2次的に配列させることができるという効果を奏する。また、上記リンカー化合物は、タンパク質との非特異的な相互作用の影響をほぼ無視することができるので、糖分子とタンパク質との相互作用を観測する際に、糖分子の生物活性を再現性よく評価することが可能になる。

【0094】

また、本発明のリガンドは、上記リンカー化合物に糖分子を導入してなるものである。

【0095】

それゆえ、上記リガンドをタンパク質分析用の支持体表面に導入することにより、2次的に複数の糖分子を再現性よく集合化させて配列させることができるので、糖分子の生物活性を再現性よく評価することが可能になるという効果を奏する。

【0096】

従って、上記リンカー化合物又はリガンドを用いることにより、糖分子と特異的に相互作用するタンパク質の検出や分離を行うためのSPRやアフィニティクロマトグラフィ、遺伝子工学でのバイオプローブ等にて、タンパク質分析用の支持体に糖分子の導入を好適に行うことができるという効果を奏する。

【図面の簡単な説明】

【図1】

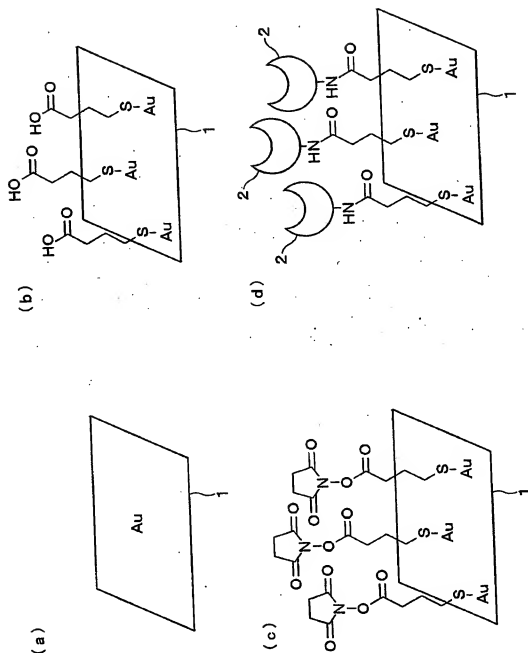
(a)～(d)は、本発明におけるリガンドを導入するために、アビジンを固定した表面プラズモン共鳴 (SPR) のセンサチップを作成する工程を示す斜視図である。

【符号の説明】

- 1 ガラス基板
- 2 アビジン (ストレプトアビジン)

【書類名】 図面

【図1】



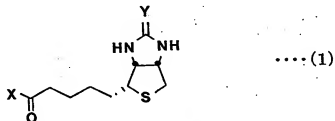
【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 タンパク質分析用の支持体表面上に、糖分子を再現性よく2次的に配列し得る新規な多岐用途型リンカー化合物、及び、新規なりガンド、並びにこれらの製造方法を提供する。

【解決手段】 多岐用途型リンカー化合物は、下記一般式(1)

【化19】



(式中、YはO又はNHで表される構造を有する)にて表される構造を備えている。上記Xは、末端に芳香族アミノ基を有するとともに主鎖に炭素-窒素結合を有していてもよい炭化水素誘導鎖を、4鎖含んでなる多分岐部位である構造を備えている。また、リガンドは、上記多岐用途型リンカー化合物に糖分子が導入されてなるものである。

【選択図】 なし

特願2002-263414

出願人履歴情報

識別番号

[396020800]

1. 変更年月日

[変更理由]

住 所

氏 名

1998年 2月24日

名称変更

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

科学技術振興事業団

特願2002-263414

出願人履歴情報

識別番号

[391012523]

1. 変更年月日

1991年 1月22日

[変更理由]

新規登録

住 所

鹿児島県鹿児島市郡元1丁目21番24号

氏 名

鹿児島大学長